B1

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12P 13/00 — A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/18228**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 43 894.6	4. Oktober 1997 (04.10.97)	DE
198 31 609.7	14. Juli 1998 (14.07.98)	DE

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D–52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: EIKMANNS, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D–89081 Ulm (DE). PETERS–WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D–51496 Bergisch–Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D–52428 Jülich (DE).

(74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker–Gundahl–Strasse 36, D–81479 München (DE).

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

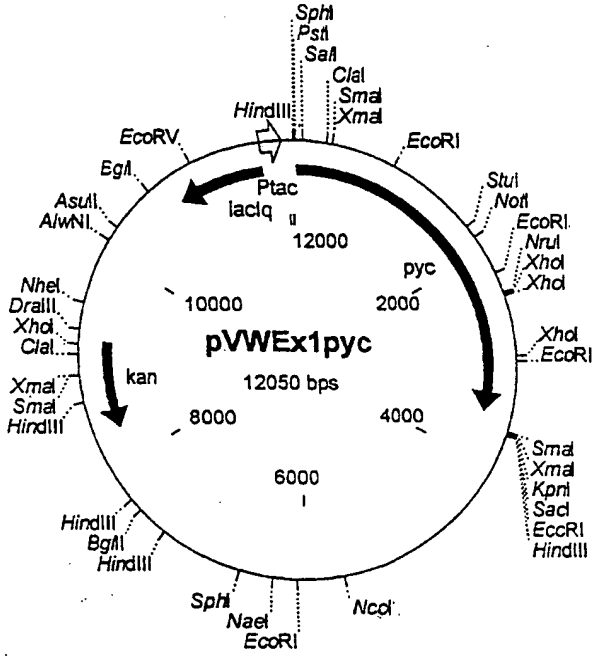
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT– UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate–carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate–carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate–carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat– und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat–Carboxylase–Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat–Carboxylase–Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzieren Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat–Carboxylase–Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Anspruch 18 bis 23, Genstrukturen nach Anspruch 24, Vektoren nach Anspruch 25, transformierte Zellen nach Anspruch 26 bis 31 sowie Verwendungen nach Anspruch 32 bis 37.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. Corynebacterium glutamicum und seine Verwandten ssp. flavum und ssp. lactofermentum (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 bis 260) wie auch Escherichia coli und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorgansimen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese

der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 3331 145), wohingegen die Erhöhung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu erhöhter Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z.B. Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese sogenannten anaplerotischen Funktionen in Corynebacterium die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, Biology of industrial micro-organisms 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company, London; Liebl, The prokaryotes II, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino und Stephanopoulos, Biotechnol Bioeng 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich wuchsen (Peters-Wendisch et al., FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269 bis 274; Gubler et al., Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857 bis 863). Dieses

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in Corynebacterium mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von Corynebacterium glutamicum gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden. Es zeigte sich weiterhin, daß überraschenderweise auch die Glutamatproduktion signifikant erhöht ist (vgl. insbesondere Ausführungsbeispiel unter 6. und Tabelle 4).

Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch Mutation des endogenen Gens. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gens zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Desweitern kann ggf durch Mutation einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorporteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. „enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-Gens in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung Corynebacterium isoliert und in einen Aminosäure-produzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere Corynebacterium oder in Escherichia coli oder Serratia marcescens, transformiert. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus C. glutamicum oder C. glutamicum ssp. flavum oder C. glutamicum ssp. lactofermentum. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z.B. Simon et al., Bio/Technology 1983, 1: 784 bis 791; Eikmanns et al., Gene 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation (Schäfer et al., J Bacteriol 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche Stämme bevorzugt, die einen erhöhten Anteil an solchen Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und / oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für Konkurrenzreaktionen zuständig sind; d.h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure-β-Methylester (AME) resistenter coryneformer Mikroorganismen-Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614).

Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Desweiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der tac-Promotor ($lacI^Q$-Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.

Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von Corynebacterium handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

Ausführungsbeispiel

1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus Corynebacterium glutamicum

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(pyc-)Genen, von Saccharomyces cerevisiae (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochim Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), Aedes aegypti (EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530) sowie von Mycobacterium tubercolosis (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des pyc-Gens von M. tuberculosis. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homolge Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von C. glutamicum ATCC 13032, die wie bei Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus C. glutamicum wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

pyc 1	5'-	CGTCTTCATCGAAATGAAC -3'
pyc 2	5'-	ACGGTGGTGATCCGGCACT -3'

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus C. glutamicum verwendet. Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von C. glutamicum und Digoxigenin-markierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von C. glutamicum zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von C. glutamicum WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, SalI, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz) transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb SalI-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment.

Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von C. glutamicum im Cosmid pHC79 verwendet, die das Genom von C. glutamicum zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der E. coli-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der

$CaCl_2$-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Habour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro LB-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanden auf Nytran N13-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauffolgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl. Nach Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3 Transformanden identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanden wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pHC79-10, das ein 40 kb Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen SalI und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 6,5 kb SalI- und ein 1,35 kb EcRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den E. coli-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment, das 1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb ClaI-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment überlappte, durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der abgeleiteten. Proteinsequenz mit der EMBL Gen-Datenbank (Heidelberg) ergab Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%) wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus Mycobacterium tuberculosis (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis 65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus C. glutamicum trägt. Die Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No.1 und die entsprechende Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus C. glutamicum wurde das Gen aus dem Plasmid pUCpyc als 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment in den E. coli-C. Glutamicum-Pendelvektor pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden aufgefüllt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pEK0pyc wurde zunächst in den Stamm E. coli DH5α transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanden isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen C. glutamicum Stammes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus C. glutamicum komplementiert werden, d.h. der Stamm, der das Plasmid pEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pEK0pyc in den C. glutamicum Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pEK0pyc)

wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5 % Lactat und auf Minimalmedium mit 2 % Lactat bzw. 4 % Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pEK0-pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm C. glutamicum DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkatemeren ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt

pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch RcaI-Klenow-SalI-Behandlung aus dem Vektor pEK0pyc isoliert und in den BamHI-Klenow-SalI behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Figur 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den C. glutamicum Stamm DG52-5 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanden verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press; mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50 % gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm C. glutamicum DM368-3

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm C. glutamicum DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanden untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40%igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stell die Nutzung des endeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Desweiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausschied als der Stamm mit nicht überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

6. Gesteigerte Akkumulation von Glutamat durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase im Wildtyp von C. glutamicum

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-, L-Threonin- und L-Homoserin-Bildung (siehe oben unter 4. und 5.)wurde auch die Akkumulation von Glutamat im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Wildtyp C. glutamicum ATCC 13032 mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Glutamatausscheidung von jeweils zwei verschiedenen Transformanden untersucht. Dazu wurde C. glutamicum ATCC 13032 (pVWEX1pyc) D1 und D2 sowie C. glutamicum ATCC 13032 (pVWEX1pyc) 1 und 2 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurde dem Medium ca. 6 Stunden nach dem Inokulieren 25 mg Tween 60 pro ml zugesetzt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Glutamatmenge bestimmt. Die Bestimmung der

Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 4 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils zwei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer bis zu 500%igen Steigerung der Glutamatkonzentration im Medium führt. Somit stell die Nutzung des endeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Glutamatbildung entscheidend zu verbessern.

Stamm	IPTG [µg/ml]	Pyruvat-Carboxylase [nmol min^{-1} mg Trockengewicht^{-1}]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

Tabelle 1

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

Tabelle 2

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

Tabelle 3

Stamm	IPTG [µg/ml]	Glutamat [mM]
ATCC 13032	200	11 ± 2
ATCC 13032	0	13 ± 2
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	200	67 ± 4
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	0	32 ± 4

Tabelle 4

Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der Gattung Corynebacterium isoliert wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13,
gekennzeichnet durch
dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.

18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.

19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.

20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.

21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor zugeordneten regulatorischen Sequenzen.

23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem zugeordnete regulatorische Gensequenzen.

24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23.

25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.

26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.

27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 25.

28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie der Gattung Corynebacterium angehört.

29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.

30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden Aminosäuren von Mikroorganismen.

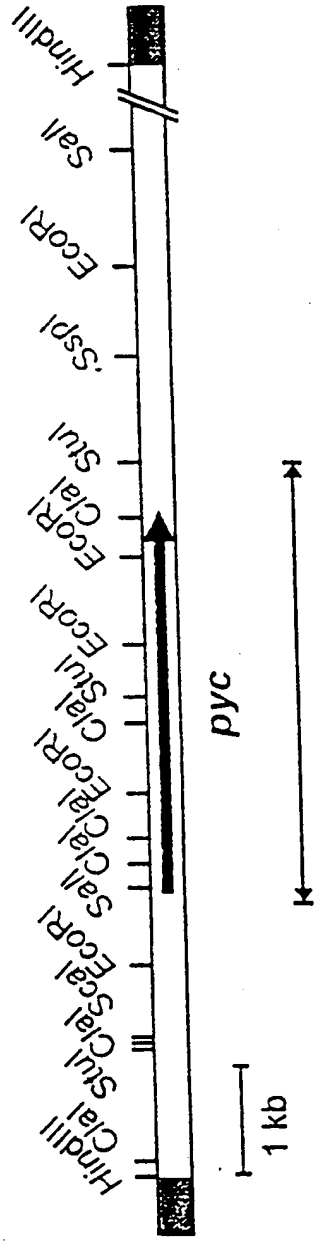
33. Verwendung nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.

34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert wird.

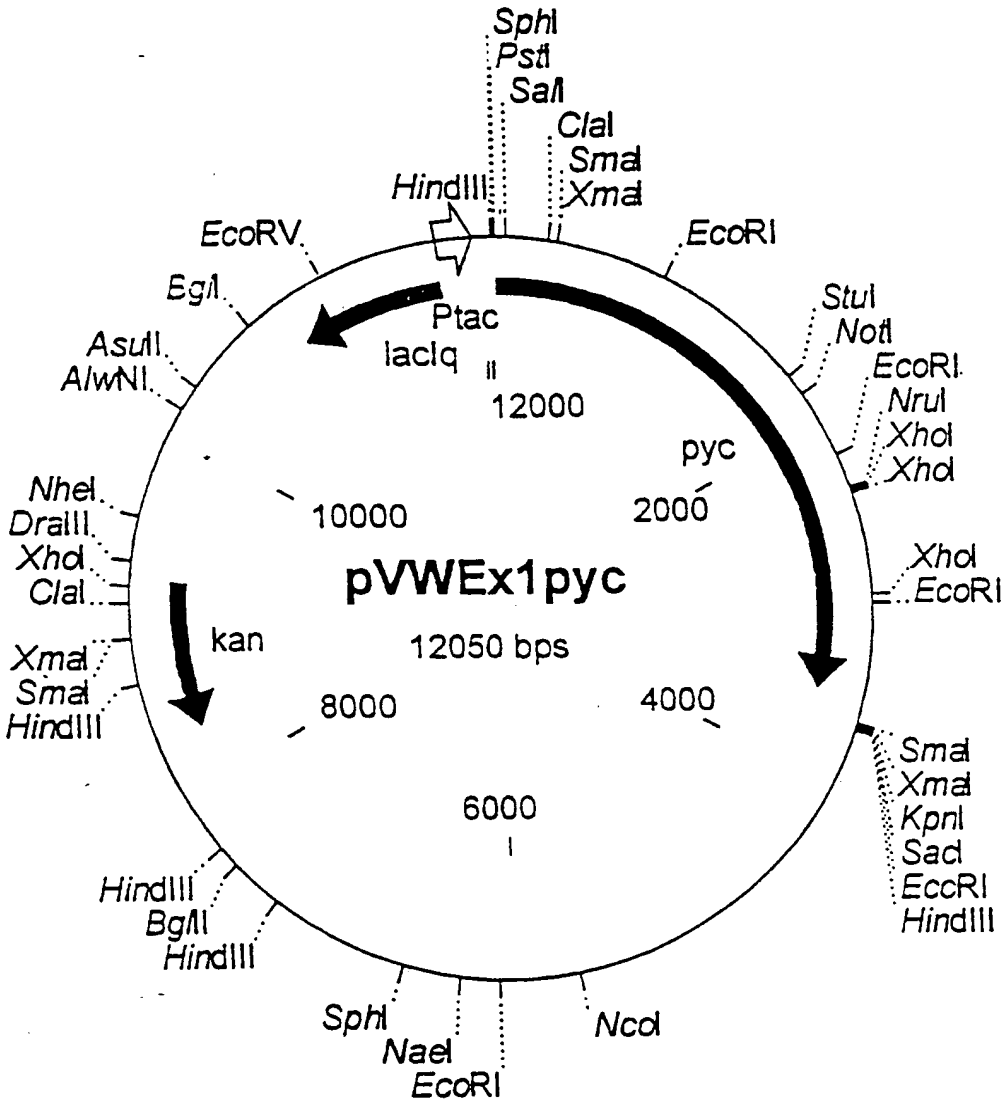
35. Verwendung nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus Corynebacterium verwendet wird.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus Corynebacterium verwendet wird.


HindIII
SalI
EcoRI
SspI
StuI
ClaI
EcoRI
ClaI
StuI
EcoRI
pyc
1 kb

Figur 1


SphI
PstI
SalI
ClaI
SmaI
XmaI
HindIII
EcoRV
EcoRI
EgII
StuI
NotI
AsuII
AlwNI
Ptac
lacIq
EcoRI
NruI
XhoI
XhoI
12000
pyc
2000
10000
NheI
DraIII
XhoI
ClaI
pVWEx1pyc
12050 bps
XhoI
EcoRI
kan
XmaI
SmaI
HindIII
8000
4000
SmaI
XmaI
KpnI
SacI
EccRI
HindIII
6000
HindIII
BglII
HindIII
SphI
NaeI
EcoRI
NcoI

Figur 2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
(B) STRASSE: Postfach 1913
(C) ORT: Juelich
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA 60

AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG 120

CTATCACCCT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTCG ACTCACACAT 180

CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC 240

GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCGTGAAG 300

ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT 360

CACCAGTCAA GGCGTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG 420

CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCCGCGAGT 480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCCAGA GGTTCTTGAT CTCACCGGTG 540

ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTTG GCGGAATCCA 600

CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT 660

TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTTGCT TCACCTGATG 720

AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG 780

CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG 840

ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC 900

AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT 960

GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT 1020

TCTTGGTCGA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG 1080

AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG 1140

CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG 1200

CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG 1260

GAACTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC 1320

AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG 1380

GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT 1440

CTGGTGTTGC AACCAACATT GGTTTCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT 1500

CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCCGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG 1560

CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC 1620

ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC 1680

TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC 1740

GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTACTGATAC CACCTTCCGC GATGCACACC 1800

AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTCG 1860

CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG 1920

CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC 1980

CGAATGTAAA CATTCAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC 2040

CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTTAAGG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC 2100

GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG 2160

AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA 2220

ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG 2280

GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA 2340

AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCACGACA 2400

CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG 2460

ACGGTGCTTC CGCACCACTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG 2520

CTGCATTCGC GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG 2580

AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC 2640

CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC 2700

AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG 2760

TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC 2820

TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA 2880

AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCCTCCAG 2940

GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC 3000

CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC 3060

GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC 3120

GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG 3180

AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG 3240

ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TGCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC 3300

AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTCACCGCA ACCGCAGAAA 3360

AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA 3420

CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAGT CGCAATCATC GAGGCTATGA 3480

AGATGGAAGC AACAATCACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG 3540

CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGCGACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA 3600

AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT 3660

GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG 3720

GCTCAAAG 3728

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
1 5 10 15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
20 25 30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
35 40 45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
50 55 60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
65 70 75 80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
85 90 95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
100 105 110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
115 120 125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
130 135 140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
145 150 155 160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
165 170 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
180 185 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

195 200 205

Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu
210 215 220

Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser
225 230 235 240

Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His
245 250 255

Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe
260 265 270

Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val
275 280 285

Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln
290 295 300

Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys
305 310 315 320

Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu
325 330 335

Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile
340 345 350

Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile
355 360 365

Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala
370 375 380

Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val
385 390 395 400

Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala
405 410 415

Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile
420 425 430

Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg
435 440 445

Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro
450 455 460

Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val
465 470 475 480

Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro

485 490 495

Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser
500 505 510

Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu
515 520 525

Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala
530 535 540

His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro
545 550 555 560

Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Lys Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu
565 570 575

Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu
580 585 590

Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val
595 600 605

Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro
610 615 620

Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser
625 630 635 640

Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln
645 650 655

Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala
660 665 670

Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys
675 680 685

Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys
690 695 700

Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg
705 710 715 720

Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp
725 730 735

Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala
740 745 750

Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala
755 760 765

Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile

770 775 780

Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu
785 790 795 800

Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr
805 810 815

Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg
820 825 830

His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr
835 840 845

Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala
850 855 860

Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser
865 870 875 880

Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp
885 890 895

Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser
900 905 910

Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp
915 920 925

Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys
930 935 940

Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala
945 950 955 960

Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro
965 970 975

Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr
980 985 990

Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg
995 1000 1005

Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg
1010 1015 1020

Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val
1025 1030 1035 1040

Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser
1045 1050 1055

Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys

1060 1065 1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala
1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala
1090 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp
1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile
1125 1130 1135

Val Val Val Ser
1140

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/18228**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE
198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D–52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: EIKMANNS, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D–89081 Ulm (DE). PETERS–WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D–51496 Bergisch–Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D–52428 Jülich (DE).

(74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker–Gundahl–Strasse 36, D–81479 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 20. Mai 1999 (20.05.99)

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

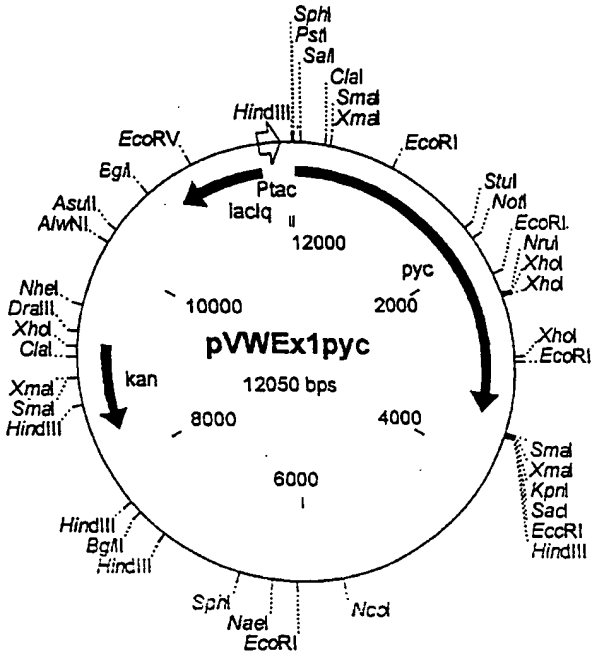
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT– UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate–carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate–carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate–carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat– und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat–Carboxylase–Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat–Carboxylase–Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzieren Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat–Carboxylase–Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien
AM	Armenien
AT	Österreich
AU	Australien
AZ	Aserbaidschan
BA	Bosnien-Herzegowina
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentralafrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CU	Kuba
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
EE	Estland
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabun
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GH	Ghana
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IL	Israel
IS	Island
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenia
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LC	St. Lucia
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LR	Liberia
LS	Lesotho
LT	Litauen
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
MX	Mexiko
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SG	Singapur
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
SZ	Swasiland
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TM	Turkmenistan
TR	Türkei
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
UG	Uganda
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam
YU	Jugoslawien
ZW	Zimbabwe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/06210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[6]: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[6]: C12P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Microbiology; Vol. 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", page 915 - page 927, see the whole article	1-37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DDBJ, Accession no. Y09548, Peters--Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 February 1998, page 20-109, 165-3587	18-25
X	Appl Microbiol Biotechnol; Vol. 47, 1997; S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", page 430 - page 440, see the whole article, in paricular page 431, column 2, limes 7-18	1-37

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 February 1999 (17.02.99)	09 March 1999 (09.03.99)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/06210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Microbiolgy, Vol. 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate Carboxylase as an Analplerotic enzyme in Corynebacerium glutamicum", page 1095 - page 1103, see the abstract and the discussion	1-37
A	Chemical Abstracts, Vol. 126, Nr 12, 24 March 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. july 1996, 1-121	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, Nr 2, February 1996, Muriel Cocaign-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", page 429 - page 436, see abstract; page 433, column 2, lines 6-32	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 July 1996 (24.07.96), see abstract	1-37
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/02/99

International application No.
PCT/EP 98/06210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P, C12N

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Microbiology, Band 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", Seite 915 - Seite 927, Siehe den ganzen Artikel --	1-37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DDBJ, accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 Feb 1998, nt 20-109, 165-3587 --	18-25

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

[X] Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mundliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachman naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17 Februar 1999	09. 03. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter
HAMPUS RYSTEDT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", Seite 430 - Seite 440, Siehe den ganzen Artikel, besonders Seite 431, Spalte 2, Zeilen 7-18	1-37
A	Microbiology, Band 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in Corynebacerium glutamicum", Seite 1095 - Seite 1103, Siehe die Zusammenfassung und die Diskussion	1-37
A	Chemical Abstracts, Band 126, Nr 12, 24 März 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. Juelich 1996, 1-121	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Band 62, Nr 2, Februar 1996, Muriel Cocaign-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", Seite 429 - Seite 436, Siehe die Zusammenfassung; Seite 433, Spalte 2, Zeilen 6-32	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 Juli 1996 (24.07.96), Siehe die Zusammenfassung	1-37

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144	18

--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören 02/02/99

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06210

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96